

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : PCT/KR2002/001547

Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 08월 13일

Date of Application AUG 13, 2002

출원인 : KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

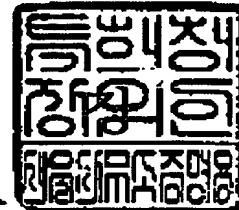
Applicant(s)



2006년 06월 07일

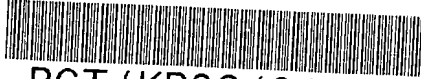
특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the

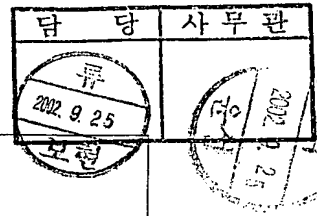
6-1-2002-0010240-08



PCT/KR02/01547

2002.09.23

수리관청 (이철승)



보정제출서

국제출원번호		PCT/KR02/01547		국제출원일	2002.08.13	우선일	2001.08.14
출원인	성명	KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.		주민등록번호		국적	Republic of Korea
	주소	373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Republic of Korea					
대리인	성명	LEE, Han-Young	대리인코드	9-1998-000375 -1	전화번호	02-596-7200	
	주소	8th Fl., Seowon Bldg., 1675-1 Seocho-dong, Seocho-gu, Seoul 137-070, Republic of Korea					
보정명령일자		09 September 2002 (09.09.2002)					
보정대상		명세서, 청구의 범위 및 요약서					
보정내용		상여백 조정(별지참조)					

특허법시행규칙 제101조제2항의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

2002년 9월 23일

출원인(대리인)

이한영

특허청장 귀하

※ 첨부서류

1. 보정서 3통

2. 대리인에 의하여 절차를 밟는 경우에는 그 대리권을 증명하는 서류 1통

50285-29511민

99. 6. 2. 개정승인

210mm×297mm

(보존용지(2중) 70g/㎡)

OmpF를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법

5 발명의 배경 기술분야

본 발명은 대장균 세포외막 단백질 F(OmpF)를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대장균에서 OmpF 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의해 형질전환된 대장균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

15 대장균에서 목적 단백질을 세포외로 분비생산시킬 경우, 대장균 세포내에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 분해(proteolysis)를 근본적으로 방지할 수 있고, 분비과정을 통하여 단백질의 올바른 접힘(folding)을 유도하여 불용성 봉입체(inclusion body)의 형성을 방지할 수 있으며, 분비 과정을 통하여 N-말단의 분비신호서열이 제거되기 때문에 세포내 생산시 불가피하게 연결되는 N-말단의 메티오닌(methionine, Met) 잔기를 갖고 있지 않는 자연상태에 존재하는 것과 동일한 아미노산 서열을 유지할 수 있으므로, 매우 효과적인 생산방법으로 알려져 있다. 또한, 대량생산의 측면에서 볼 때, 단백질 과잉생산에 따른 세포에 주는 부담이 훨씬 줄어들어 고농도 배양 및 연속배양을 통한 단백질 대량생산이 가능하고, 자연 상태에서 대장균에서 배양액으로 분비하는 단백질은 거의 없기 때문에, 목적 단백질의 순수분리가 매우 용이하다는 장점도 있다.

이와 같이 세포외 분비생산이 갖는 장점으로 인하여, 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산에 관하여 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 지금까지 진행되어온 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산은 다음과 같이 크게 세가지로 분류할 수 있다: 첫째, 분비신호서열(signal peptide)과 목적 단백질 유전자의 융합방법에 관한 연구인데, 토크소이(Toksoy) 등은 말토오스 결합 단백질(maltose binding protein, MBP)과 분비신호서열을 융합시켜서 *TaqI* 단백질을 세포외 분비생산하였고, 로(Lo) 등은 고초균(*Bacillus subtilis*)에서 유래한 베타-1,4-엔도글루카나제(β -1,4-endoglucanase)를 대장균에서 발현한 결과, 세포외 분비생산이 일어나고 있음을 확인하였으며, 나가하리(Nagahari) 등은 OmpF 단백질의

분비신호서열 및 N-말단 8개 아미노산과의 융합방법을 이용하여 베타-엔
 돌핀을 세포외 분비생산하였고, 야마모토(Yamamoto) 등은 앞서와 같은
 OmpF 분비신호서열과의 융합방법을 이용하여 하비뮤린사코마바이러스
 (harvey murine sarcoma virus)에서 유래한 p21 단백질의 분비생산을 시
 5 도하였으나, 분비생산되지 않고 세포질내에 불용성 응집체 형태로 축적되
 었다고 보고하였다(참조: Toksoy E. et al., *Biotechnology Techniques*,
 13:803-808, 1999; Lo A. C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2287-
 2292, 1988; Nagahari et al., *EMBO J.*, 4:3589-3592, 1985; Yamamoto
 et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35:615-621, 1991). 둘째, 대장균에
 10 서 단백질 분비에 관여하는 단백질의 동시생산방법을 이용하는 연구가 진
 행되었는데, 바닉스(Baneyx) 등은 OmpA-TEM- β -락타메이즈 융합 단백
 질의 분비생산에 대장균의 막단백질인 TolAIII 단백질의 동시생산 방법
 을 이용하였고, 로빈슨(Robbens) 등은 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2)의 생
 산에 있어 *kil* 유전자의 동시발현방법을 사용하였으며, 반데르발(van der
 15 Wal) 등은 베타-락타메이즈의 세포외 분비생산에 대장균의 지질단백질인
 박테리오신 분비 단백질(bacteriocin release protein, BRP)을 이용할 수
 있음을 보고하였고, 아리스티도우(Aristidou) 등은 BRP를 이용한 세포외
 분비생산에서 배지내에 글리신의 첨가가 분비효율을 높이는데 효과가 있
 다고 보고하였다(참조: Baneyx F. and Eugene W. M., *Protein Expr.*
 20 *Purif.*, 14:13-22, 1998; Robbens J. et al., *Protein Expr. Purif.*, 6:481-
 486, 1995; van der Wal F. J. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:392-
 398, 1998; Aristidou A. A. et al., *Biotechnol. Lett.*, 15:331-336, 1993).
 셋째, 세포외막이 없는 대장균을 이용하는 방법으로, 소위 L-형이라 불리
 우는 이 돌연변이체는 대장균의 세포외막을 제거함으로써 주변세포질 없
 25 이 세포내막으로만 세포가 형성되어 있는 상태이므로, 기존의 널리 이용
 되어 왔던 주변세포질로의 단백질 분비생산 방법을 이용하였을 때 세포내
 막만 통과하면 주변세포질 없이 바로 세포 배양액으로 노출이 되기 때문
 에 세포외 분비생산이 가능하다는 점을 이용한 것인데, 쿠자우(Kujau) 등
 은 L-형 대장균인 RV308 균주를 사용하여 미니항체(miniantibody,
 30 miniAb)를 세포외로 분비생산하였음을 보고하였다(참조: Kujau M. J. et al.,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 49:51-58, 1998).

이와 같이 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산을 위해 다
 양한 방법들이 개발되어 왔으나, 아직도 여러가지 문제점들이 해결되지
 않고 남아 있다. 대표적인 것이 분비되는 단백질의 부분용해현상이다.
 35 이론상으로는, 단백질이 분비될 때 용해현상이 일어나지 않아야 하지만,
 실제적으로는 세포내 단백질 분해효소에 의한 부분용해현상이 발생하고 있
 어, 단백질의 정제과정이 복잡해질 뿐만 아니라, 고농도 배양이 불가능하

다는 단점이 대두되었다. 이를 극복하기 위하여, 여러가지 노력이 계속되고 있으며, 일부 그룹에서는 L-형의 대장균을 사용하는 방법을 적용하기도 하였으나, 외부자극에 대한 저항력이 약하고, 생활주기(life cycle)가 짧아서, 고농도 배양에 적합하지 못하다는 점이 단점으로 지적되었다.

- 5 따라서, 대장균에서 효율적으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

발명의 요약

- 10 이에, 본 발명자는 대장균에서 효율적으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 목적 단백질의 유전자와 대장균의 세포외막 단백질 F(OmpF)의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 대장균에서 발현시킬 경우, 목적 단백질이 대장균으로부터 세포배양액으로 효율적으로 분비생산되며, 세포 배양액의 용합 단백질로부터
15 OmpF를 제거하고 원하는 재조합 단백질만을 쉽게 분리, 정제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 OmpF의 유전자와 목적 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는 것이다.

- 20 본 발명의 다른 목적은 전기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

25 도면의 상세한 설명

상술한 본 발명의 목적 및 구성은 하기 첨부도면 및 설명에 의하여 더욱 명확해 진다.

- 30 도 1은 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 나타내는 유전자 지도이다.
도 2는 재조합 발현벡터 pOmpF6를 나타내는 유전자 지도이다.
도 3은 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 나타내는 유전자 지도이다.
도 4는 재조합 발현벡터 pEDOmpF3를 나타내는 유전자 지도이다.
35 도 5는 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4를 나타내는 유전자 지도이다.
도 6은 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E의 제작과정 및 유전자 지도이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 발현백터는 옴피실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다.

- 5 전기 발현백터를 이용하여 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 방법은 전기 발현백터에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 목적 단백질의 유전자를 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현백터를 작제하는 공정;
- 10 전기 재조합 발현백터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 공정; 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합단백질을 수득하는 공정; 및, 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함한다: 이때, 단백질 분해효소로는 팩터 Xa(Factor Xa), 엔테로키나제(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), 게네나제(His-Tyr 또는 Tyr-His), IgA 프로테아제(Pro/Ser-Arg/Thr-Pro-Pro-Thr/Ser/Ala-Pro), 인테인, 트롬빈, 트립신, 펩신, 서브틸리신 또는 플라스민을 사용할 수 있으나, 팩터 Xa를 사용함이 바람직
- 15 하고, 목적 단백질로는 펩타이드, 효소, 항체 등의 OmpF와 융합 가능한 모든 단백질을 사용할 수 있으나, 베타-엔돌핀을 사용함이 바람직하며, 숙주세포로는 특별히 제한되는 것은 아니나, 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물 또는 살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물을 사용함이 바람직하다.
- 20 미생물 또는 살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물을 사용함이 바람직하다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

- 본 발명자들은 재조합 단백질 생산에 널리 이용되는 6개의 대장균
- 25 주들 (BL21(DE3), HB101, JM101, MC4100, XL1-Blue, W3110)을 배양하고, 이로부터 세포외막 단백질을 분획하여 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분석한 결과, 6가지 대장균주 중에 BL21(DE3)에서 OmpF 단백질이 과다 발현되고 있음을 확인하였다. 본 발명자들이 대장균 OmpF 발현시스템을 위해 제조한 재조합 발현백터 pOmpF6는 대장균 OmpF 유전자, OmpF 프
- 30 로모터 및 옴피실린 저항 유전자를 포함한다. 이때, OmpF 유전자 및 프로모터는 대장균 BL21(DE3) 염색체로부터 PCR 방법을 이용하여 수득하였다. 전기 재조합 발현백터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101을 대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)이라 명명하고, 그를 2001년 6월 1일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행
- 35 (KCTC)에 기탁번호 KCTC 1026BP로 기탁하였다.

이어, 전기 재조합 발현백터 pOmpF6를 이용한 OmpF-융합단백질

SUBSTITUTE SHEET

의 분비생산의 일 실시예로서, 베타-엔돌핀을 대장균에서 분비생산하도록, 베타-엔돌핀을 코딩하는 cDNA, OmpF 단백질을 암호화하는 유전자, OmpF 프로모터, OmpF 단백질과 베타-엔돌핀 사이에 삽입된 팩터 Xa 인식 및 절단을 위한 4개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드 (oligopeptide) 및 엠펙실린 저항 유전자(ampicillin resistance gene)를 포함하는 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 작제하고, 이를 OmpF 유전자가

5 결합된 대장균 BL21(DE3)(Novagen Co., 미국)에 도입하여, 형질전환체를 제조한 다음, 이를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-베타-엔돌핀 융합단 단백질을 수득하였다. 전기 수득한 융합단단백질을 음이온 교환 크로마토그

10 래피 방법으로 1차 정제하고, 단백질 분해효소인 팩터 Xa를 처리하여 OmpF 단백질을 절단함으로써, 온전한 형태의 베타-엔돌핀을 얻을 수가 있었다.

종래의 기술에 의하여 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 경우, 대부분 대장균의 단백질분해효소에 의한 용해현상이 수반되어, 고농도 배

15 양이 실질적으로 불가능하지만, 본 발명에 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비하여 간단한 방법으로 목적 단백

20 질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로, 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로,

25 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: OmpF 과다발현 대장균의 선택

30 재조합 단백질 생산에 널리 이용되는 대표적인 6가지 대장균을 선별하여, 각각의 대장균으로부터 세포외막 단백질을 분리하고, SDS-PAGE 젤 전기영동을 수행하여 비교하여 보았다. 선별된 6가지 대장균은 대장균 BL21(DE3)[*F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) a prophage*

35 *carrying the T7 RNA polymerase gene*](Novagen Co., 미국), HB101[*F- hsdS20 (rk-, mk-) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20(str) xyl1-5 mtl-1 supE44 λ -*](New England Biolabs, 미국),

- JM101[supE thi-1 Δ (lac-proAB) [F'traD36 proAB lacIqZ Δ M15]](Stratagene Co., 미국), MC4100[F- *araD139* Δ (*argF-lac*)U169 *rpsL150(strr)* *relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR*](Stratagene Co., 미국), XL1-Blue[*SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac* F(*proAB+ lacIq lacZM15 Tn10(tetr)*)](Stratagene Co., 미국) 및 W3110[derived from K-12, λ -, F-, prototrophic](KCTC 2223)으로서 각각을 250mL 플라스크에서 배양하였으며, 배양온도는 37°C, 사용한 배지는 50mL LB 배지(트립톤 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L)를 사용하였다.
- 10 각각의 배양물로 부터 균주를 회수한 다음, 각 대장균의 세포 외막 단백질을 다음과 같은 방법으로 분획하였다: 배양액 3mL를 4°C에서 3500 x g로 5분동안 원심분리하여 침전물을 수득하고, 1mL Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액으로 한번 세척한 후에 다시 4°C에서 3500 x g로 5분 동안 원심분리하여 수득한 침전물을 Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액 0.5mL에 현탁
- 15 하였다. 이어, 현탁액을 초음파 처리(sonication)하여 현탁액 속의 모든 세포를 파쇄하고, 실온에서 10,000 x g로 2분동안 원심분리하여 세포 파편(debris)이 제거된 상층액을 수득하였으며, 이를 실온에서 10000 x g로 30분동안 원심분리하고, 0.5mL 0.5%(w/v) 사르코실(sarcosyl)/10M Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액에 현탁하여 세포막 단백질 분획을 수득하였다.
- 20 전기 수득한 세포막 단백질 분획을 37°C에서 30분동안 방치시키고, 4°C에서 10,000 x g로 30분동안 원심분리하여 불용상을 수득하고, 10mM Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액으로 세척한 다음, 50 μ L PBS(0.274M NaCl, 0.041M Na₂HPO₄, 0.047M KH₂PO₄, 0.005M KCl, pH 7.4) 용액에 현탁하여 세포 외막 단백질 분획시료를 수득하였다(참조: Puenete, J.L. *et al.*, *Gene*, 156:1-9, 1995). 수득한 각각의 세포 외막 단백질 분획시료 64 μ L
- 25 를 SDS-PAGE 젤 전기영동을 수행한 결과, 대장균 BL21(DE3)에서 다량의 OmpF 단백질이 생성됨을 알 수 있었다.

실시예 2: *ompF* 유전자가 결여된 대장균의 제조

30

- 박테리오파아지 레드오페론(red operon, *exo-beta-gam*)을 사용하여, 대장균 BL21(DE3)의 *ompF* 유전자를 제거하였다: 즉, 박테리오파아지 레드오페론을 주형으로 하고, 프라이머 1: 5'-CGCGCCATGGATATTAATACTGAAACTGAGATCAAGC-3'(서열번호
- 35 1)과 프라이머 2: 5'-CGGGATCCTCATCGCCATTGCTCCCCAAATAC-3'(서열번호 2)를 이용하여, PCR 방법을 수행한 다음, 수득한 절편을 아가로스 젤 전기영동법(agarose gel electrophoresis)으로 약 2kb 크기의

DNA 절편을 분리하고, 제한효소인 *NcoI*과 *BamHI*으로 절단하였다. 한편, *trc* 프로모터를 갖고 있는 발현벡터 pTrc99A(Pharmacia Biotech Co., 미국)를 제한효소 *NcoI*과 *BamHI*으로 절단하고, 전기 PCR 절편을 연결시켜서 발현벡터를 작제한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환시켰다. 이어, 형질전환된 균주를 항생제 엠피실린(ampicillin, 50 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 수득하였다(참조: 도 1). 도 1은 재조합 발현벡터 pTrcEBG의 유전자 지도이다. 이어, 대장균 BL21(DE3)균주를 앞에서 수득한 pTrcEBG로 형질전환하였으며, 형질전환 균주는 항생제 엠피실린이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었다. 이 형질전환 균주를 500mL LB 배지에서 세포농도 O.D.₆₀₀ 0.3 까지 배양한 다음, 1mM IPTG를 배지에 첨가하여 발현벡터 pTrcEBG에 클로닝된 *exo-beta-gam* 유전자의 발현을 유도하였다. 1시간 경과 후, 세포를 원심분리하여 회수하고, 3차 증류수 250mL에 세척하였다. 회수된 세포를 10%(v/v) 글리세롤 10mL에 현탁한 다음, 다시 원심분리를 통하여 세포를 회수하여 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

한편, 대장균 BL21(DE3)로부터 수득한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 3: 5'-CGGAATTCTGGATTATACCGACGCAG-3'(서열번호 3)과 프라이머 4: 5'-GCGGATCCTTAGAACTGGTAAACGATAC-3'(서열번호 4)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 2160bp의 PCR 절편을 수득하였다. 이를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단하여 pBluescript SK(-)(Stratagene Cloning Systems, 미국)에 클로닝하고, 대장균 XL1-Blue에 도입시켜, 형질전환시켰으며, 이로부터 재조합 발현벡터 pOmpF6를 수득하였다(참조: 도 2). 도 2는 재조합 발현벡터 pOmpF6를 나타내는 유전자 지도이다. 또한, 발현벡터 pACYC177(New England Biolabs, 미국)을 주형으로 하고, 프라이머 5: 5'-CGCTGCAGTTAGAAAACTCATCGAGCATC-3'(서열번호 5)과 프라이머 6: 5'-GCCTGCAGGCCACGTTGTGTCCTCAAA-3'(서열번호 6)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 940bp의 PCR 절편을 수득하였다. 이를 *PstI*으로 절단하여 pOmpF6에 도입시키고, 대장균 XL1-Blue에 도입시켜서 형질전환시켰으며, 이로부터 카나마이신 저항유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 수득하였다(참조: 도 3). 도 3은 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 나타내는 유전자 지도이다. 도 3에서 보듯이, 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm은 대장균 BL21(DE3)에서 유래한 *ompF* 유전자 및 그 프로모터 지역을 갖고 있고, 카나마이신 저항유전자는 *ompF* 유전자의 5' 말단과 프로모터 사이에 삽입이 되어 있어 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm에서 *ompF* 유전자의 발현은 일어날 수 없다. 전기 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 주형으로 하고, 프라이머 3과 4를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 카나마이신 저항 유전자가 중간에 삽

입된 *ompF* 유전자 및 그 프로모터 지역을 포함한 PCR 절편을 수득하였다. 이를 전기 pTrcEBG로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)균주에 도입하여, 형질전환시켰으며, 형질전환 균주는 항생제 엠피실린과 카나마이신이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하였다. 선별된 재조합 균주로부터 재조합 발현백터 pTrcEBG를 제거하기 위하여, 항생제 엠피실린이 첨가되지 않은 LB배지에서 2일동안 5회 계대배양을 수행하고, 항생제 카나마이신이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여, 항생제 엠피실린이 첨가된 LB 평판 배지에서 성장하지 못하는 균주를 최종적으로 선별하였다. 그런 다음, 이들의 게놈 DNA를 분리하여 염색체내 *ompF* 유전자 위치에 카나마이신 유전자가 삽입이 되어있는지 여부를 PCR 방법으로 확인하였다: 즉, 전기 분리한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 3과 프라이머 8: 5'-GATCGGAATTGATTTGAGTTTCC-3'(서열번호 8)을 이용하여 PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편의 분석결과 및 동일한 주형, 프라이머 7: 5'-CCACAGCAACGGTGTCGTCTG-3'(서열번호 7) 및 프라이머 9: 5'-ATCTTTATCTTTGTAGCACTTTCAC-3'(서열번호 9)를 이용하여 PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편의 분석결과를 통하여 카나마이신 유전자가 대장균 BL21(DE3)의 *ompF* 유전자 위치에 삽입이 되었음을 확인하고, 전기 형질전환 균주를 "대장균 BL101"이라 명명하였다.

20 실시예 3: *ompF* 유전자 발현시스템의 개발

실시예 2의 재조합 대장균 대장균 BL101에서 OmpF 단백질을 발현하기 위하여 세가지의 재조합 플라스미드를 제작하였다.

첫째, 강력한 유도발현 프로모터인 T7 프로모터를 이용한 *ompF* 유전자 발현백터를 제작하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 4와 프라이머 10: 5'-GCGAATTCATATGATGAAGCGCAATATTCTG-3'(서열번호 10)을 사용하여 PCR 반응을 수행하고, 수득한 절편을 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*로 절단하여 발현백터 pET21c(Novagen, 미국)에 도입하여 클로닝한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현백터 pEDOmpF3를 수득하였다(참조: 도 4). 도 4는 재조합 발현백터 pEDOmpF3의 유전자 지도이다.

둘째, 유도발현 프로모터인 Trc 프로모터를 이용한 *ompF* 유전자 발현백터를 제작하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 4와 프라이머 11: 5'-GCGAATTCCATGGTGAAGCGCAATATTCTGGCAG-3'(서열번호 11)을 사용하여 PCR 반응을 수행하고, 수득한 절편을 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*

으로 절단하여 발현벡터 pTrc99A에 도입하여 클로닝한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4를 수득하였다(참조: 도 5). 도 5는 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4의 유전자 지도이다.

- 5 세 번째로, OmpF 자체의 프로모터를 이용하기 위한 벡터로서는 실시예 2에서 제작한 pOmpF6를 이용하였다.

- 10 세가지 재조합 발현벡터(pEDOmpF3, pTrcOmpF4, pOmpF6)를 실시예 2에서 제조한 대장균 BL101 균주에 각각 도입하여 형질전환시키고, 항생제 카나마이신과 엠피실린이 첨가된 LB 평판배지에서 각각의 형질전환된 균주를 선별하였다. 이어, 각각의 발현 시스템에서 OmpF 단백질이
15 가장 효율적으로 분비되는 시스템을 선택하기 위하여, 선별된 각각의 재조합 대장균주를 단순배지인 50mL R/2 배지{(NH₄)₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 6.75g/L, 시트르산 0.85g/L, MgSO₄·7H₂O 0.7g/L, 5M HCL/L, FeSO₄·7H₂O 10g/L, ZnSO₄·7H₂O 2.25g/L, CuSO₄·5H₂O 1g/L, MnSO₄·5H₂O 0.5g/L, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.23g/L, CaCl₂·2H₂O 2g/L, (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0.1g/L, 포도당 10g/L}에서 37℃의 조건으로 배양하였다.

- 20 재조합 발현벡터 pEDOmpF3와 pTrcOmpF4로 형질전환된 균주의 배양액의 O.D.₆₀₀이 0.7일 때, 1mM IPTG(isopropyl-β-thiogalactoside)를 첨가하여 *ompF* 유전자의 발현을 유도하였다. 또한, 대조균으로 형질전환되지 않은 대장균 BL21(DE3)와 대장균 BL101을 동일한 조건으로 배양한 다음, 실시예 1의 방법으로 배양된 각 균주의 세포 외막단백질 분
25 획을 수득하고 이를 전기영동한 결과, pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101에서 모균주인 대장균 BL21(DE3)에서와 비슷한 수준의 OmpF 단백질이 생성되어 세포외막에 존재하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 결과를 바탕으로 OmpF 융합 단백질 발현 시스템에 OmpF 프로모터를 이용한 방법이 가장 적합함을 알 수 있었다.

이에, 본 발명자들은 재조합 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101을 "대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)"라 명명하고, 이를 2001년 6월 1일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 1026BP로 기탁하였다.

30

실시예 4: OmpF-베타-엔돌핀 발현벡터의 제작

- 35 베타-엔돌핀은 31개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이를 암호화하는 유전자는 총 93개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있다(참조: Takahashi H. et al., FEBS Lett., 135:97-102, 1981).

이를 제조하기 위하여, 프라이머 12: 5'-ACCGCCATACCTTCCCTCGATGAACTGGTAAACGATA-3'(서열번호

12), 프라이머 13: 5'-
 GGAAGGTATGGCGGTTTCATGACCAGCGAAAAAAGCCAGAC-3'(서열
 번호 13), 프라이머 14: 5'-
 CGCGTTTTTAAACAGGGTCACCAGCGGGGTCTGGCTTTTTTCGC-
 5 3'(서열번호 14), 프라이머 15: 5'-
 CCCTGTTTTAAAAACGCGATCATCAAAAACGCGTATAAAAAAG-3'(서
 열번호 15) 및 프라이머 16: 5'-
 GCGGATCCCTATTATTCGCCTTTTTTATACGCGTTTTTTG-3'(서열번
 호 16)을 각각 합성하고, 이들을 혼합하여 PCR을 수행하였다. 또한, 대
 장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 10과 12를 이
 용하여 PCR을 수행하였다. 각각 수득한 PCR 절편을 혼합하고, 프라이
 머 10과 16을 첨가하여 다시 PCR을 수행한 결과, *ompF* 유전자의 말단에
 팩터 Xa 인식 및 절단부위인 4개의 아미노산과 베타-엔돌핀을 암호화하
 는 유전자가 융합된 PCR 절편을 수득하였다. 전기 PCR 절편을 제한효
 소 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하고, 재조합 발현벡터 pOmpF6의 *Bgl*II와 *Xba*I
 15 위치에 도입하여 클로닝하였다. 그런 다음, 이를 대장균 XL1-Blue에 도
 입하여 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 작제하였다(참조: 도 6). 도 6은
 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E의 제작과정 및 유전자 지도이다. 전기 재조
 합 발현벡터 pOmpF6 β E에서 *ompF* 유전자에 연결된 베타-엔돌핀의 아미
 20 노산 서열은 Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu
 Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 Stop(서열번호 17)이고, 유전자 서열은 5'-
 TATGGCGGTTTCATGACCAGCGAAAAAAGCCAGACCCCGCTGGTGA
 CCCTGTTTTAAAAACGCGATCATCAAAAACGCGTATAAAAAAGGCGA
 25 ATAA-3'(서열번호 18)이다.

전기 수득한 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 대장균 BL101에 도
 입하여 형질전환체를 제조하고, 이를 카나마이신과 엠펜실린이 첨가된 LB
 평판배지에서 배양하여, 형질전환체를 선별하였다.

30 실시예 5: OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질의 세포외 분비 생산

실시예 4에서 제조된 형질전환체를 1.8L R/2배지에 접종하고,
 37℃에서 유가식 배양방법으로 배양하였다. 이때, 공급기질액의 조성은
 포도당 700g/L, MgSO₄·7H₂O 20g/L이고, 배지내 pH가 6.88이상일 때, 공
 35 급기질액이 배양액으로 10mL/min의 속도로 유입되어, 배양액내의 포도당
 의 농도를 0.7g/L로 유지하도록 조절하고, 배지내 용존산소량(DO)은
 40%(v/v)로 유지되도록 공기 및 순수산소가 자동 조절되어 공급되었다.

배양을 진행하면서 시간의 경과에 따라, 분광광도계로 600nm 파장에서 광학밀도(O.D.)를 측정하고, 200ml씩 배양액을 추출하였다. 상기 배양을 17시간 30분 동안 수행한 결과, 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 150.5이고, 세포건조 중량은 54.1g/L임을 확인하였다.

- 5 세포배양액으로 분비된 단백질을 확인하기 위하여, 시산의 경과에 따라 추출보관된 배양액을 원심분리하여 상층액을 수득하고, 상층액 10 μ l씩 취하여 전기영동을 수행한 결과, 약 40 kDa 크기의 OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질이 세포배양액으로 분비되어 축적되고 있음을 확인하였고, 배양 시간의 경과에 따라 축적되는 양은 점점 증가하여 최종적으로 세포배양액
- 10 에 존재하는 전체단백질의 45%에 해당하는 4.64g/L의 융합단백질이 축적되어 있음을 알 수 있었다.

실시예 6: 세포외로 분비 생산된 베타-엔돌핀의 순수분리

- 15 실시예 5의 배양액에 축적된 OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질로부터 베타-엔돌핀을 순수하게 분리하였다: 먼저, 음이온교환크로마토그래피 방법을 사용하였는데, 이동상으로는 50mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액을 이
- 20 용하고, 음이온 교환수지로는 Q2-컬럼(BIO-RAD Co., 미국)을 이용하였으며, 이동상의 이동속도는 1mL/min이고, 용출방법으로는 이동상에 NaCl 의 농도가 0 에서 1M로 비례적으로 증가되는 경사 용리(gradient elution) 방법을 이용하였다. 그 결과, 약 0.45M의 NaCl 농도에서 OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질이 용출되어, OmpF-베타 엔돌핀 융합단
- 25 백질 89.1mg을 분리하였다. 분리된 OmpF-베타 엔돌핀 융합단백질 수용액에 함유된 NaCl은 투석방법으로 제거하고, OmpF-베타-엔돌핀 융합 단
- 30 백질로부터 OmpF 단백질을 제거하기 위하여 단백질 분해효소인 팩터 Xa 를 1:200(w/w) 비율로 융합단백질과 혼합한 다음, 23℃에서 12시간동안 반응시켰다. 이어, 베타-엔돌핀을 순수분리하기 위하여 역상 HPLC(reverse phase high performance liquid chromatography) 방법을 사용하였는데, HPLC 컬럼으로는 Microsorb-MV C₁₈ 컬럼(4.6 x 250 mm, Varian, 미국)을 사용하고, 이동상으로는 0.1%(v/v) TFA(trifluoroacetic acid) 수용액을 사용하며, 유속은 1mL/min이고, 검출은 파장 280 nm에서 자외선 검출기를 사용하였다(참조: 표 1).

표 1

- 35 베타-엔돌핀의 순수분리

정제과정	부피 (ml)	총단백질 (mg)	융합단백질 (mg)	베타-엔돌핀 (mg)	회수율 (%)	순도 (%)
배양액	50	515	232	20.3	100	3.9
음이온 교환수지	63	118.8	89.1	7.8	38.4	5.9
RP-HPLC	12	2.8	-	2.8	13.8	>99

상기 표 1에서 보듯이, HPLC를 통하여 분리정제된 시료를 전기영
 동한 결과, 베타-엔돌핀 2.8mg이 순수분리되었음을 알 수 있었다. 정제
 된 베타-엔돌핀의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, Tyr-Gly-Gly-
 5 Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys로서 이는 베타-엔돌핀의 N-말단과 일치함
 을 확인하였다.

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 대장균에서
 OmpF 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에
 10 의해 형질전환된 대장균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포의
 로 분비생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 옴피실
 린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다. 본 발명에
 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성
 장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아
 15 짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비
 하여 간단한 방법으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로,
 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당
 20 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지
 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이
 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구
 항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

25

30

SUBSTITUTE SHEET

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 9쪽 26줄 내지 29줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학 재료에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□	
기탁기관 유전자은행(KCTC)	
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기재) 유전자은행(KCTC) (305-333) 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52번지 생명공학연구소(KRIBB)	
기탁날짜 2001. 06. 01.	기탁번호 KCTC 1026BP
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 다음 페이지에 계속□	
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 사항	
E. 별도의 보충적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임 (표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 기재란	국제사무국 기재란
<input type="checkbox"/> 국제출원과 함께 수리되었음	<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의하여 수리되었음
담당관	담당관

특허청구의 범위

1. 옴피실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함하고, 도 2의 유전자 지도를 가지는 발현벡터 pOmpF6.

5

2. 제 1항의 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)(KCTC 1026BP).

3. (i) 제 1항의 발현벡터 pOmpF6에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 목적 단백질을 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현벡터를 작제하는 공정;

(ii) 전기 재조합 발현벡터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 공정;

15 (iii) 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합 단백질을 수득하는 공정; 및,

(iv) 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함하는, 발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

20

4. 제 3항에 있어서,

단백질 분해효소는 팩터 Xa(Factor Xa), 엔테로키나제, 게네나제, IgA 프로테아제, 인테인, 트롬빈, 트립신, 펩신, 서브틸리신 또는플라스민인 것을 특징으로 하는

25 발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

5. 제 3항에 있어서,

목적 단백질은 OmpF와 융합 가능한 펩타이드, 효소 또는 항체인 것을 특징으로 하는

30 발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

6. 제 3항에 있어서,

목적 단백질은 베타-엔돌핀인 것을 특징으로 하는 발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

35

7. 제 3항에 있어서,

재조합 발현벡터는 pOmpF6 β E인 것을 특징으로 하는

SUBSTITUTE SHEET

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

8. 제 3항에 있어서,

숙주세포는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물 또는

살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물인 것을 특징으로 하는

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

5

10

15

20

25

30

35

SUBSTITUTE SHEET

ABSTRACT

The present invention provides an expression vector comprising a gene coding for OmpF protein in E. coli, E.coli transformed with the said expression vector, and a method for extracellular production of target proteins employing the said microorganism. The recombinant expression vector of the invention comprises ampicillin-resistant gene, OmpF promoter and OmpF gene. In accordance with the invention, a target protein can be produced extracellularly by simpler method than conventional methods in a manner that: secretory production of OmpF fusion protein begins simultaneously with growth of cells due to constitutive expression employing OmpF promoter, and as the concentration of cells increases, the amount of secretory production of the protein also increases continuously. Therefore, target proteins can be produced in large quantities by a high concentration culture of cells.

SUBSTITUTE SHEET

2002.08.13

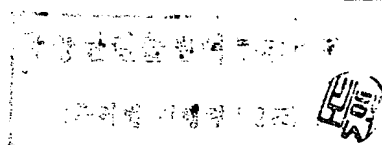
$$1/4 \text{ AR}(0) - \text{FAR}$$

P0229-KAIST

iginal (for SUBMISSION) - printed on 13.08.2002 04:10:35 PM

수리관청 (정해영)		only	PCT/KR 0-2 / 01547
O-2	International Filing Date		13 AUGUST 2002 (13.08.02)
O-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"		Korean Intellectual Property Office P C T International Application
O-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request		
O-4-1	Prepared using		PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
O-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty		
O-6	Receiving Office (specified by the applicant)		Korean Intellectual Property Office (RO/KR)
O-7	Applicant's or agent's file reference		P0229-KAIST
I	Title of invention		A Method for Extracellular Production of Target Proteins Employing OmpF in E. coli
II	Applicant		
II-1	This person is:		applicant only
II-2	Applicant for		all designated States except US
II-4	Name		KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
II-5	Address:		373-1 Kusong-dong Yusong-gu 305-701 Taejon Republic of Korea
II-6	State of nationality		KR
II-7	State of residence		KR
II-8	Telephone No.		82-42-869-2183
II-9	Facsimile No.		82-42-869-2190
III-1	Applicant and/or inventor		
III-1-1	This person is:		applicant and inventor
III-1-2	Applicant for		US only
III-1-4	Name (LAST, First)		LEE, Sang-Yup
III-1-5	Address:		212-702 EXPO Apartment, 464-1 Jeonmin-dong Yusong-gu 305-390 Taejon Republic of Korea
III-1-6	State of nationality		KR
III-1-7	State of residence		KR

(D. 10) 2 1/2 1/2 1/2



담 룡 사 무 관
2012. 9. 7
보청

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 13.08.2002 04:10:35 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	JEONG, Ki-Jun
III-2-5	Address:	102-411 KAIST Apartment, 392-3 Kung-dong Yusong-gu 305-335 Taejon Republic of Korea
III-2-6	State of nationality	KR
III-2-7	State of residence	KR
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Han-Young
IV-1-2	Address:	8th Fl., Seowon Bldg. 1675-1 Seocho-dong Seocho-gu 137-070 Seoul Republic of Korea
IV-1-3	Telephone No.	82-2-596-7200
IV-1-4	Facsimile No.	82-2-596-7280
IV-1-5	e-mail	leepat@unitel.co.kr
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	--
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	CN JP US 3
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 13.08.2002 04:10:35 PM

VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	14 August 2001 (14.08.2001)	
VI-1-2	Number	2001-48881	
VI-1-3	Country	KR	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Korean Intellectual Property Office (KIPO) (ISA/KR)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	13	-
IX-3	Claims	2	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	4	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	24	
IX-6	Sequence listing part of description	7	-
IX-7	TOTAL	31	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-9	Original separate power of attorney	✓	-
IX-16	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16 - (ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	2	
IX-20	Language of filing of the international application	Korean	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 13.08.2002 04:10:35 PM

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Han-Young

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	13 AUGUST 2002 (13.08.02)
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/KR
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

P0229-KAIST

Original (for SUBMISSION) - printed on 13.08.2002 04:10:35 PM

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only			
0-1	International Application No.	PCT/KR 02/01547		
0-2	Date stamp of the receiving Office	13.08.2002		
0-4	Form - PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet			
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)		
0-9	Applicant's or agent's file reference	P0229-KAIST		
2	Applicant	KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, et al.		
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (KRW)	
12-1	Transmittal fee T	⇒	45,000	
12-2-1	Search fee S	⇒	150,000	
12-2-2	International search to be carried out by	KR		
12-3	International fee			
	Basic fee (first 30 sheets) b1	530,000		
12-4	Remaining sheets	1		
12-5	Additional amount (X)	12,000		
12-6	Total additional amount b2	12,000		
12-7	b1 + b2 = B	542,000		
12-8	Designation fees			
	Number of designations contained in international application	3		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 5)	3		
12-10	Amount of designation fee (X)	114,000		
12-11	Total designation fees D	342,000		
12-12	PCT-EASY fee reduction R	-163,000		
12-13	Total International fee (B+D-R) I	⇒	721,000	
12-14	Fee for priority document			
	Number of priority documents requested	1		
12-15	Fee per document (X)	0		
12-16	Total priority document fee P	⇒	0	
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒	916,000	
12-19	Mode of payment	cash		

VALIDATION LOG AND REMARKS

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION) - printed on 13.08.2002 04:10:35 PM

13-2-1	Validation messages Request	Green? A translation of the international application into English will have to be prepared under the responsibility of the ISA selected.
		Green? Please note that the entire request (including the title of invention) must be in English
		Green? The title of the invention should preferably be entered in capital letters. Please verify.
13-2-2	Validation messages States	Green? More designations could be made. The following States have not been designated: AP: (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); EA: (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); EP: (AT, BE, BG, CH, LI, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR); OA: (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG); AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, LI, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. Please verify.
13-2-5	Validation messages Biology	Green? Biology: Several PCT contracting States require these indications to be included in the description. Please verify.
13-2-8	Validation messages Fees	Green? Please confirm that fee schedule utilized is the latest available
13-2-1 1	Validation messages For receiving Office/International Bureau use only	Green? Verify electronic data for consistency against printed form.

OmpF를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법

발명의 배경

5 기술분야

본 발명은 대장균 세포외막 단백질 F(OmpF)를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대장균에서 OmpF 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의해 형질전환된 대장균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

15 대장균에서 목적 단백질을 세포외로 분비생산시킬 경우, 대장균 세포내에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 분해(proteolysis)를 근본적으로 방지할 수 있고, 분비과정을 통하여 단백질의 올바른 접힘(folding)을 유도하여 불용성 봉입체(inclusion body)의 형성을 방지할 수 있으며, 분비과정을 통하여 N-말단의 분비신호서열이 제거되기 때문에 세포내 생산시 불가피하게 연결되는 N-말단의 메티오닌(methionine, Met) 잔기를 갖고 있지 않는 자연상태에 존재하는 것과 동일한 아미노산 서열을 유지할 수 있으므로, 매우 효과적인 생산방법으로 알려져 있다. 또한, 대량생산의 측면에서 볼 때, 단백질 과잉생산에 따른 세포에 주는 부담이 훨씬 줄어들어 고농도 배양 및 연속배양을 통한 단백질 대량생산이 가능하고, 자연 상태에서 대장균에서 배양액으로 분비하는 단백질은 거의 없기 때문에, 25 목적 단백질의 순수분리가 매우 용이하다는 장점도 있다.

이와 같이 세포외 분비생산이 갖는 장점으로 인하여, 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산에 관하여 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 지금까지 진행되어온 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산은 다음과 같이 크게 세가지로 분류할 수 있다: 첫째, 분비신호서열(signal peptide)과 목적 단백질 유전자의 융합방법에 관한 연구인데, 토크소이(Toksoy) 등은 말토오스 결합 단백질(maltose binding protein, MBP)과 분비신호서열을 융합시켜서 TaqI 단백질을 세포외 분비생산하였고, 로(Lo) 등은 고초균(*Bacillus subtilis*)에서 유래한 베타-1,4-엔도글루카나제(β -1,4-endoglucanase)를 대장균에서 발현한 결과, 세포외 분비생산이 일어나고 있음을 확인하였으며, 나가하리(Nagahari) 등은 OmpF 단백질의 분비신호서열 및 N-말단 8개 아미노산과의 융합방법을 이용하여 베타-엔

돌핀을 세포의 분비생산하였고, 야마모토(Yamamoto) 등은 앞에서와 같은 OmpF 분비신호서열과의 융합방법을 이용하여 하비뮤린사코마바이러스(harvey murine sarcoma virus)에서 유래한 p21 단백질의 분비생산을 시도하였으나, 분비생산되지 않고 세포질내에 불용성 응집체 형태로 축적되었다고 보고하였다(참조: Toksoy E. et al., *Biotechnology Techniques*, 13:803-808, 1999; Lo A. C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2287-2292, 1988; Nagahari et al., *EMBO J.*, 4:3589-3592, 1985; Yamamoto et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35:615-621, 1991).

둘째, 대장균에서 단백질 분비에 관여하는 단백질의 동시생산방법을 이용하는 연구가 진행되었는데, 바넥스(Baneyx) 등은 OmpA-TEM- β -락타데이즈 융합 단백질의 분비생산에 대장균의 막단백질인 TolAIII 단백질의 동시생산 방법을 이용하였고, 로빈슨(Robbens) 등은 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2)의 생산에 있어 *kil* 유전자의 동시발현방법을 사용하였으며, 반데르발(van der Wal) 등은 베타-락타데이즈의 세포의 분비생산에 대장균의 지질단백질인 박테리오신 분비 단백질(bacteriocin release protein, BRP)을 이용할 수 있음을 보고하였고, 아리스티도우(Aristidou) 등은 BRP를 이용한 세포의 분비생산에서 배지내에 글리신의 첨가가 분비효율을 높이는데 효과가 있다고 보고하였다(참조: Baneyx F. and Eugene W. M., *Protein Expr. Purif.*, 14:13-22, 1998; Robbins J. et al., *Protein Expr. Purif.*, 6:481-486, 1995; van der Wal F. J. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:392-398, 1998; Aristidou A. A. et al., *Biotechnol. Lett.*, 15:331-336, 1993).

셋째, 세포외막이 없는 대장균을 이용하는 방법으로, 소위 L-형이라 불리우는 이 돌연변이체는 대장균의 세포외막을 제거함으로써 주변세포질 없이 세포내막으로만 세포가 형성되어 있는 상태이므로, 기존의 널리 이용되어 왔던 주변세포질로의 단백질 분비생산 방법을 이용하였을 때 세포내막단 통과하면 주변세포질 없이 바로 세포 배양액으로 노출이 되기 때문에 세포의 분비생산이 가능하다는 점을 이용한 것인데, 쿠자우(Kujau) 등은 L-형 대장균인 RV308 균주를 사용하여 미니항체(miniantibody, miniAb)를 세포외로 분비생산하였음을 보고하였다(참조: Kujau M. J. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49:51-58, 1998).

이와 같이 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산을 위해 다양한 방법들이 개발되어 왔으나, 아직도 여러가지 문제점들이 해결되지 않고 남아 있다. 대표적인 것이 분비되는 단백질의 부분용해현상이다. 이론상으로는, 단백질이 분비될 때 용해현상이 일어나지 않아야 하지만, 실제적으로는 세포내 단백질 분해효소에 의한 부분용해현상이 발생하고 있어, 단백질의 정제과정이 복잡해질 뿐만 아니라, 고농도 배양이 불가능하다는 단점이 대두되었다. 이를 극복하기 위하여, 여러가지 노력이 계속되

고 있으며, 일부 그룹에서는 L-형의 대장균을 사용하는 방법을 적용하기도 하였으나, 외부자극에 대한 저항력이 약하고, 생활주기(life cycle)가 짧아서, 고농도 배양에 적합하지 못하다는 점이 단점으로 지적되었다.

따라서, 대장균에서 효율적으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

발명의 요약

이에, 본 발명자는 대장균에서 효율적으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 목적 단백질의 유전자와 대장균의 세포외막 단백질 F(OmpF)의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 대장균에서 발현시킬 경우, 목적 단백질이 대장균으로부터 세포배양액으로 효율적으로 분비생산되며, 세포 배양액의 용합 단백질로부터 OmpF를 제거하고 원하는 재조합 단백질만을 쉽게 분리, 정제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 OmpF의 유전자와 목적 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

도면의 상세한 설명

상술한 본 발명의 목적 및 구성은 하기 첨부도면 및 설명에 의하여 더욱 명확해 진다.

도 1은 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 나타내는 유전자 지도이다.
 도 2는 재조합 발현벡터 pOmpF6를 나타내는 유전자 지도이다.
 도 3은 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 나타내는 유전자 지도이다.
 도 4는 재조합 발현벡터 pEDOmpF3를 나타내는 유전자 지도이다.
 도 5는 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4를 나타내는 유전자 지도이다.
 도 6은 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E의 제작과정 및 유전자 지도이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 발현벡터는 옴피실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다.

- 5 전기 발현벡터를 이용하여 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 방법은 전기 발현벡터에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 목적 단백질의 유전자를 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현벡터를 작제하는 공정; 전기 재조합 발현벡터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형
- 10 질전환체를 제조하는 공정; 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합단백질을 수득하는 공정; 및, 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함한다: 이때, 단백질 분해효소로는 팩터 Xa(Factor Xa), 엔테로키나제(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), 게네나제(His-Tyr 또는 Tyr-His), IgA 프로테아제(Pro/Ser-Arg/Thr-Pro-Pro-Thr/Ser/Ala-Pro), 인테인, 트롬빈, 트립신, 펩신, 서브틸리신 또는 플라스민을 사용할 수 있으나, 팩터 Xa를 사용함이 바람직
- 15 하고, 목적 단백질로는 펩타이드, 효소, 항체 등의 OmpF와 융합 가능한 모든 단백질을 사용할 수 있으나, 베타-엔돌핀을 사용함이 바람직하며, 숙주세포로는 특별히 제한되는 것은 아니나, 에스케리키아(*Escherichia*) 속
- 20 미생물 또는 살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물을 사용함이 바람직하다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

- 본 발명자들은 재조합 단백질 생산에 널리 이용되는 6개의 대장균
- 25 주들 (BL21(DE3), HB101, JM101, MC4100, XL1-Blue, W3110)을 배양하고, 이로부터 세포외막 단백질을 분획하여 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분석한 결과, 6가지 대장균주 중에 BL21(DE3)에서 OmpF 단백질이 과다 발현되고 있음을 확인하였다. 본 발명자들이 대장균 OmpF 발현시스템을 위해 제조한 재조합 발현벡터 pOmpF6는 대장균 OmpF 유전자, OmpF 프
- 30 로모터 및 옴피실린 저항 유전자를 포함한다. 이때, OmpF 유전자 및 프로모터는 대장균 BL21(DE3) 열색체로부터 PCR 방법을 이용하여 수득하였다. 전기 재조합 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101을 대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)이라 명명하고, 그를 2001년 6월 1일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행
- 35 (KCTC)에 기탁번호 KCTC 1026BP로 기탁하였다.

이어, 전기 재조합 발현벡터 pOmpF6를 이용한 OmpF-융합단백질

의 분비생산의 일 실시예로서, 베타-엔돌핀을 대장균에서 분비생산하도록, 베타-엔돌핀을 코딩하는 cDNA, OmpF 단백질을 암호화하는 유전자, OmpF 프로모터, OmpF 단백질과 베타-엔돌핀 사이에 삽입된 팩터 Xa 인식 및 절단을 위한 4개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드 (oligopeptide) 및 엠포실린 저항 유전자(ampicillin resistance gene)를 포함하는 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 작제하고, 이를 OmpF 유전자가 결여된 대장균 BL21(DE3)(Novagen Co., 미국)에 도입하여, 형질전환체를 제조한 다음, 이를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질을 수득하였다. 전기 수득한 융합단백질을 음이온 교환 크로마토그 래피 방법으로 1차 정제하고, 단백질 분해효소인 팩터 Xa를 처리하여 OmpF 단백질을 절단함으로써, 온전한 형태의 베타-엔돌핀을 얻을 수가 있었다.

종래의 기술에 의하여 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 경우, 대부분 대장균의 단백질분해효소에 의한 용해현상이 수반되어, 고농도 배양이 실질적으로 불가능하지만, 본 발명에 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비하여 간단한 방법으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로, 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: OmpF 과다발현 대장균의 선택

30

재조합 단백질 생산에 널리 이용되는 대표적인 6가지 대장균을 선별하여, 각각의 대장균으로부터 세포외막 단백질을 분리하고, SDS-PAGE 젤 전기영동을 수행하여 비교하여 보았다. 선별된 6가지 대장균은 대장균 BL21(DE3)[*F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) a prophage* carrying the T7 RNA polymerase gene](Novagen Co., 미국), HB101[*F- hsdS20 (rk-, mk-) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20(str) xyl1-5 mtl-1 supE44 λ -*](New England Biolabs, 미국),

JM101[*supE thi-1 Δ(lac-proAB) [F'traD36 proAB lacIqZ Δ M15]]*(Stratagene Co., 미국), MC4100[*F- araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150(strr) relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR*](Stratagene Co., 미국), XL1-Blue[*SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac*
 5 *F(proAB+ lacIq lacZM15 Tn10(tetr))*](Stratagene Co., 미국) 및 W3110[derived from K-12, λ -, F-, prototrophic](KCTC 2223)으로서 각각을 250mL 플라스크에서 배양하였으며, 배양온도는 37°C, 사용한 배지는 50mL LB 배지(트립톤 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L)를 사용하였다.

10 각각의 배양물로 부터 균주를 회수한 다음, 각 대장균의 세포 외막 단백질을 다음과 같은 방법으로 분획하였다: 배양액 3mL를 4°C에서 3500 x g로 5분동안 원심분리하여 침전물을 수득하고, 1mL Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액으로 한번 세척한 후에 다시 4°C에서 3500 x g로 5분 동안 원심분리하여 수득한 침전물을 Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액 0.5mL에 현탁
 15 하였다. 이어, 현탁액을 초음파 처리(sonication)하여 현탁액 속의 모든 세포를 파쇄하고, 실온에서 10,000 x g로 2분동안 원심분리하여 세포 파편(debris)이 제거된 상층액을 수득하였으며, 이를 실온에서 10000 x g로 30분동안 원심분리하고, 0.5mL 0.5%(w/v) 사르코실(sarcosyl)/10M Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액에 현탁하여 세포막 단백질 분획을 수득하였다.
 20 전기 수득한 세포막 단백질 분획을 37°C에서 30분동안 방치시키고, 4°C에서 10,000 x g로 30분동안 원심분리하여 불용상을 수득하고, 10mM Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액으로 세척한 다음, 50 μ L PBS(0.274M NaCl, 0.041M Na₂HPO₄, 0.047M KH₂PO₄, 0.005M KCl, pH 7.4) 용액에 현탁하여 세포 외막 단백질 분획시료를 수득하였다(참조: Puenete, J.L. *et al.*,
 25 *Gene*, 156:1-9, 1995). 수득한 각각의 세포 외막 단백질 분획시료 64 μ L를 SDS-PAGE 젤 전기영동을 수행한 결과, 대장균 BL21(DE3)에서 다량의 OmpF 단백질이 생성됨을 알 수 있었다.

실시예 2: *ompF* 유전자가 결여된 대장균의 제조

30 박테리오파아지 레드오페톤(red operon, *exo-beta-gam*)을 사용하여, 대장균 BL21(DE3)의 *ompF* 유전자를 제거하였다: 즉, 박테리오파아지 레드오페톤을 주형으로 하고, 프라이머 1: 5'-CGCGCCATGGATATTAATACTGAACTGAGATCAAGC-3'(서열번호
 35 1)과 프라이머 2: 5'-CGGGATCCTCATCGCCATTGCTCCCCAAATAC-3'(서열번호 2)를 이용하여, PCR 방법을 수행한 다음, 수득한 절편을 아가로스 젤 전기영동법(agarose gel electrophoresis)으로 약 2kb 크기의

DNA 절편을 분리하고, 제한효소인 *NcoI*과 *BamHI*으로 절단하였다. 한편, *trc* 프로모터를 갖고 있는 발현벡터 pTrc99A(Pharmacia Biotech Co., 미국)를 제한효소 *NcoI*과 *BamHI*으로 절단하고, 전기 PCR 절편을 연결시켜서 발현벡터를 작제한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환시켰다. 이어, 형질전환된 균주를 항생제 엠피실린(ampicillin, 50 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별gk고, 이로부터 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 수득하였다(참조: 도 1). 도 1은 재조합 발현벡터 pTrcEBG의 유전자 지도이다. 이어, 대장균 BL21(DE3)균주를 앞에서 수득한 pTrcEBG로 형질전환하였으며, 형질전환 균주는 항생제 엠피실린이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었다. 이 형질전환 균주를 500mL LB 배지에서 세포농도 O.D.₆₀₀ 0.3 까지 배양한 다음, 1mM IPTG를 배지에 첨가하여 발현벡터 pTrcEBG에 클로닝된 *exo-beta-gam* 유전자의 발현을 유도하였다. 1시간 경과 후, 세포를 원심분리하여 회수하고, 3차 증류수 250mL에 세척하였다. 회수된 세포를 10%(v/v) 글리세롤 10mL에 현탁한 다음, 다시 원심분리를 통하여 세포를 회수하여 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

한편, 대장균 BL21(DE3)로부터 수득한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 3: 5'-CGGAATTCTGGATTATACCGACGCAG-3'(서열번호 3)과 프라이머 4: 5'-GCGGATCCTTAGAACTGGTAAACGATAC-3'(서열번호 4)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 2160bp의 PCR 절편을 수득하였다. 이를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단하여 pBluescript SK(-)(Stratagene Cloning Systems, 미국)에 클로닝하고, 대장균 XL1-Blue에 도입시켜, 형질전환시켰으며, 이로부터 재조합 발현벡터 pOmpF6를 수득하였다(참조: 도 2). 도 2는 재조합 발현벡터 pOmpF6를 나타내는 유전자 지도이다. 또한, 발현벡터 pACYC177(New England Biolabs, 미국)을 주형으로 하고, 프라이머 5: 5'-CGCTGCAGTTAGAAAACTCATCGAGCATC-3'(서열번호 5)과 프라이머 6: 5'-GCCTGCAGGCCACGTTGTGTCCTCAAA-3'(서열번호 6)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 940bp의 PCR 절편을 수득하였다. 이를 *PstI*으로 절단하여 pOmpF6에 도입시키고, 대장균 XL1-Blue에 도입시켜서 형질전환시켰으며, 이로부터 카나마이신 저항유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 수득하였다(참조: 도 3). 도 3은 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 나타내는 유전자 지도이다. 도 3에서 보듯이, 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm은 대장균 BL21(DE3)에서 유래한 *ompF* 유전자 및 그 프로모터 지역을 갖고 있고, 카나마이신 저항유전자는 *ompF* 유전자의 5' 말단과 프로모터 사이에 삽입이 되어 있어 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm에서 *ompF* 유전자의 발현은 일어날 수 없다. 전기 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 주형으로 하고, 프라이머 3과 4를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 카나마이신 저항 유전자가 중간에 삽

입된 *ompF* 유전자 및 그 프로모터 지역을 포함한 PCR 절편을 수득하였다. 이를 전기 pTrcEBG로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)균주에 도입하여, 형질전환시켰으며, 형질전환 균주는 항생제 엠피실린과 카나마이신이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하였다. 선별된 재조합 균주로부터 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 제거하기 위하여, 항생제 엠피실린이 첨가되지 않은 LB배지에서 2일동안 5회 계대배양을 수행하고, 항생제 카나마이신이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여, 항생제 엠피실린이 첨가된 LB 평판 배지에서 성장하지 못하는 균주를 최종적으로 선별하였다. 그런 다음, 이들의 게놈 DNA를 분리하여 염색체내 *ompF* 유전자 위치에 카나마이신 유전자가 삽입이 되어있는지 여부를 PCR 방법으로 확인하였다: 즉, 전기 분리한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 3과 프라이머 8: 5'-GATCGGAATTGATTTGAGTTTCC-3'(서열번호 8)을 이용하여 PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편의 분석결과 및 동일한 주형, 프라이머 7: 5'-CCACAGCAACGGTGTCGTCTG-3'(서열번호 7) 및 프라이머 9: 5'-ATCTTTATCTTTGTAGCACTTTCAC-3'(서열번호 9)를 이용하여 PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편의 분석결과를 통하여 카나마이신 유전자가 대장균 BL21(DE3)의 *ompF* 유전자 위치에 삽입이 되었음을 확인하고, 전기 형질전환 균주를 "대장균 BL101"이라 명명하였다.

20 실시예 3: *ompF* 유전자 발현시스템의 개발

실시예 2의 재조합 대장균 대장균 BL101에서 OmpF 단백질을 발현하기 위하여 세가지의 재조합 플라스미드를 제작하였다.

첫째, 강력한 유도발현 프로모터인 T7 프로모터를 이용한 *ompF* 유전자 발현벡터를 제작하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 4와 프라이머 10: 5'-GCGAATTCATATGATGAAGCGCAATATTCTG-3'(서열번호 10)을 사용하여 PCR 반응을 수행하고, 수득한 절편을 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 발현벡터 pET21c(Novagen, 미국)에 도입하여 클로닝한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현벡터 pEDOmpF3를 수득하였다(참조: 도 4). 도 4는 재조합 발현벡터 pEDOmpF3의 유전자 지도이다.

둘째, 유도발현 프로모터인 Trc 프로모터를 이용한 *ompF* 유전자 발현벡터를 제작하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 4와 프라이머 11: 5'-GCGAATTCCATGGTGAAGCGCAATATTCTGGCAG-3'(서열번호 11)을 사용하여 PCR 반응을 수행하고, 수득한 절편을 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*

으로 절단하여 발현벡터 pTrc99A에 도입하여 클로닝한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4를 수득하였다(참조: 도 5). 도 5는 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4의 유전자 지도이다.

세 번째로, OmpF 자체의 프로모터를 이용하기 위한 벡터로서는 실시예 2에서 제작한 pOmpF6를 이용하였다.

세가지 재조합 발현벡터(pEDOmpF3, pTrcOmpF4, pOmpF6)를 실시예 2에서 제조한 대장균 BL101 균주에 각각 도입하여 형질전환시키고, 항생제 카나마이신과 엠피실린이 첨가된 LB 평판배지에서 각각의 형질전환된 균주를 선별하였다. 이어, 각각의 발현 시스템에서 OmpF 단백질이 가장 효율적으로 분비되는 시스템을 선택하기 위하여, 선별된 각각의 재조합 대장균주를 단순배지인 50mL R/2 배지{(NH₄)₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 6.75g/L, 시트르산 0.85g/L, MgSO₄·7H₂O 0.7g/L, 5M HCL/L, FeSO₄·7H₂O 10g/L, ZnSO₄·7H₂O 2.25g/L, CuSO₄·5H₂O 1g/L, MnSO₄·5H₂O 0.5g/L, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.23g/L, CaCl₂·2H₂O 2g/L, (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0.1g/L, 포도당 10g/L}에서 37℃의 조건으로 배양하였다.

재조합 발현벡터 pEDOmpF3와 pTrcOmpF4로 형질전환된 균주의 배양액의 O.D.₆₀₀이 0.7일 때, 1mM IPTG(isopropyl-β-thiogalactoside)를 첨가하여 *ompF* 유전자의 발현을 유도하였다. 또한, 대조군으로 형질전환되지 않은 대장균 BL21(DE3)와 대장균 BL101을 동일한 조건으로 배양한 다음, 실시예 1의 방법으로 배양된 각 균주의 세포 외막단백질 분획을 수득하고 이를 전기영동한 결과, pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101에서 모균주인 대장균 BL21(DE3)에서와 비슷한 수준의 OmpF 단백질이 생성되어 세포외막에 존재하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 결과를 바탕으로 OmpF 융합 단백질 발현 시스템에 OmpF 프로모터를 이용한 방법이 가장 적합함을 알 수 있었다.

이에, 본 발명자들은 재조합 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101을 "대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)"라 명명하고, 이를 2001년 6월 1일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 1026BP로 기탁하였다.

실시예 4: OmpF-베타-엔돌핀 발현벡터의 제작

베타-엔돌핀은 31개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이를 암호화하는 유전자는 총 93개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있다(참조: Takahashi H. et al., FEBS Lett., 135:97-102, 1981).

이를 제조하기 위하여, 프라이머 12: 5'-ACCGCCATACCTTCCCTCGATGAACTGGTAAACGATA-3'(서열번호

12), 프라이머 13: 5'-
 GGAAGGTATGGCGGTTTCATGACCAGCGAAAAAAGCCAGAC-3'(서열
 번호 13), 프라이머 14: 5'-
 CGCGTTTTTTTAAACAGGGTCACCAGCGGGGTCTGGCTTTTTTTCGC-
 5 3'(서열번호 14), 프라이머 15: 5'-
 CCCTGTTTTAAAAACGCGATCATCAAAAACGCGTATAAAAAAG-3'(서
 열번호 15) 및 프라이머 16: 5'-
 GCGGATCCCTATTATTCGCCTTTTTTTATACGCGTTTTTTG-3'(서열번
 10 호 16)을 각각 합성하고, 이들을 혼합하여 PCR을 수행하였다. 또한, 대
 장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 10과 12를 이
 용하여 PCR을 수행하였다. 각각 수득한 PCR 절편을 혼합하고, 프라이
 머 10과 16을 첨가하여 다시 PCR을 수행한 결과, *ompF* 유전자의 말단에
 팩터 Xa 인식 및 절단부위인 4개의 아미노산과 베타-엔돌핀을 암호화하
 는 유전자가 융합된 PCR 절편을 수득하였다. 전기 PCR 절편을 제한효
 15 소 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하고, 재조합 발현벡터 pOmpF6의 *Bgl*II와 *Xba*I
 위치에 도입하여 클로닝하였다. 그런 다음, 이를 대장균 XL1-Blue에 도
 입하여 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 작제하였다(참조: 도 6). 도 6은
 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E의 제작과정 및 유전자 지도이다. 전기 재조
 합 발현벡터 pOmpF6 β E에서 *ompF* 유전자에 연결된 베타-엔돌핀의 아미
 20 노산 서열은 Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu
 Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 Stop(서열번호 17)이고, 유전자 서열은 5'-
 TATGGCGGTTTTCATGACCAGCGAAAAAAGCCAGACCCCGCTGGTGA
 CCCTGTTTTAAAAACGCGATCATCAAAAACGCGTATAAAAAAGGCGA
 25 ATAA-3'(서열번호 18)이다.

전기 수득한 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 대장균 BL101에 도
 입하여 형질전환체를 제조하고, 이를 카나마이신과 엠포실린이 첨가된 LB
 평판배지에서 배양하여, 형질전환체를 선별하였다.

30 실시예 5: OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질의 세포의 분비 생산

실시예 4에서 제조된 형질전환체를 1.8L R/2배지에 접종하고,
 37°C에서 유가식 배양방법으로 배양하였다. 이때, 공급기질액의 조성은
 포도당 700g/L, MgSO₄·7H₂O 20g/L이고, 배지내 pH가 6.83이상일 때, 공
 35 급기질액이 배양액으로 10mL/min의 속도로 유입되어, 배양액내의 포도당
 의 농도를 0.7g/L로 유지하도록 조절하고, 배지내 용존산소량(DO)은
 40%(v/v)로 유지되도록 공기 및 순수산소가 자동 조절되어 공급되었다.

- 배양을 진행하면서 시간의 경과에 따라, 분광광도계로 600nm 파장에서 광학밀도(O.D.)를 측정하고, 200ml씩 배양액을 추출하였다. 상기 배양을 17시간 30분 동안 수행한 결과, 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 150.5이고, 세포건조 중량은 54.1g/L임을 확인하였다.
- 5 세포배양액으로 분비된 단백질을 확인하기 위하여, 시산의 경과에 따라 추출보관된 배양액을 원심분리하여 상층액을 수득하고, 상층액 10 μ l씩 취하여 전기영동을 수행한 결과, 약 40 kDa 크기의 OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질이 세포배양액으로 분비되어 축적되고 있음을 확인하였고, 배양
- 10 시간의 경과에 따라 축적되는 양은 점점 증가하여 최종적으로 세포배양액에 존재하는 전체단백질의 45%에 해당하는 4.64g/L의 융합단백질이 축적되어 있음을 알 수 있었다.

실시예 6: 세포외로 분비 생산된 베타-엔돌핀의 순수분리

- 15 실시예 5의 배양액에 축적된 OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질로부터 베타-엔돌핀을 순수하게 분리하였다: 먼저, 음이온교환크로마토그래피 방법을 사용하였는데, 이동상으로는 50mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액을 이용하고, 음이온 교환수지로는 Q2-컬럼(BIO-RAD Co., 미국)을 이용하였으며, 이동상의 이동속도는 1mL/min이고, 용출방법으로는 이동상에 NaCl
- 20 의 농도가 0 에서 1M로 비례적으로 증가되는 경사 용리(gradient elution) 방법을 이용하였다. 그 결과, 약 0.45M의 NaCl 농도에서 OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질이 용출되어, OmpF-베타 엔돌핀 융합단백질 89.1mg을 분리하였다. 분리된 OmpF-베타 엔돌핀 융합단백질 수용액에 함유된 NaCl은 투석방법으로 제거하고, OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질로부터 OmpF 단백질을 제거하기 위하여 단백질 분해효소인 팩터 Xa
- 25 를 1:200(w/w) 비율로 융합단백질과 혼합한 다음, 23℃에서 12시간동안 반응시켰다. 이어, 베타-엔돌핀을 순수분리하기 위하여 역상 HPLC(reverse phase high performance liquid chromatography) 방법을 사용하였는데, HPLC 컬럼으로는 Microsorb-MV C₁₈ 컬럼(4.6 x 250 mm, Varian, 미국)을 사용하고, 이동상으로는 0.1%(v/v) TFA(trifluoroacetic acid) 수용액을 사용하며, 유속은 1mL/min이고, 검출은 파장 280 nm에서 자외선 검출기를 사용하였다(참조: 표 1).
- 30

표 1

35 베타-엔돌핀의 순수분리

정제과정	부피	총단백질	융합단백질	베타-엔돌핀	회수율	순도
------	----	------	-------	--------	-----	----

	(ml)	(mg)	(mg)	(mg)	(%)	(%)
배양액	50	515	232	20.3	100	3.9
음이온 교환수지	63	118.8	89.1	7.8	38.4	5.9
RP-HPLC	12	2.8	-	2.8	13.8	>99

상기 표 1에서 보듯이, HPLC를 통하여 분리정제된 시료를 전기영
 동한 결과, 베타-엔돌핀 2.8mg이 순수분리되었음을 알 수 있었다. 정제
 된 베타-엔돌핀의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, Tyr-Gly-Gly-
 5 Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys로서 이는 베타-엔돌핀의 N-말단과 일치함
 을 확인하였다.

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 대장균에서
 OmpF 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에
 10 의해 형질전환된 대장균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외
 로 분비생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 옴피실
 린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다. 본 발명에
 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성
 장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아
 15 짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비
 하여 간단한 방법으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로,
 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

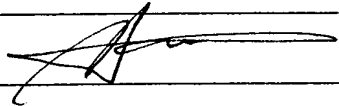
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당
 20 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지
 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이
 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구
 항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

25

30

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 9쪽 26줄 내지 29줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학 재료에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□	
기탁기관 유전자은행(KCTC)	
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기재) 유전자은행(KCTC) (305-333) 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52번지 생명공학연구소(KRIBB)	
기탁날짜 2001. 06. 01.	기탁번호 KCTC 1026BP
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 다음 페이지에 계속□	
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 사항	
E. 별도의 보충적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임 (표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 기재란
<input type="checkbox"/> 국제출원과 함께 수리되었음
담당관 

국제사무국 기재란
<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의하여 수리되었음
담당관

특허청구의 범위

1. 옴피실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함하고, 도 2의 유전자 지도를 가지는 발현벡터 pOmpF6.

5

2. 제 1항의 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)(KCTC 1026BP).

3. (i) 제 1항의 발현벡터 pOmpF6에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 목적 단백질을 유전자를 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현벡터를 작제하는 공정;

(ii) 전기 재조합 발현벡터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 공정;

15 (iii) 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합 단백질을 수득하는 공정; 및,

(iv) 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함하는, 발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

20

4. 제 3항에 있어서,

단백질 분해효소는 팩터 Xa(Factor Xa), 엔테로키나제, 게네나제, IgA 프로테아제, 인테인, 트롬빈, 트립신, 펩신, 서브틸리신 또는 플라스민인 것을 특징으로 하는

25

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

5. 제 3항에 있어서,

목적 단백질은 OmpF와 융합 가능한 펩타이드, 효소 또는 항체인 것을 특징으로 하는

30

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

6. 제 3항에 있어서,

목적 단백질은 베타-엔돌핀인 것을 특징으로 하는

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

35

7. 제 3항에 있어서,

재조합 발현벡터는 pOmpF6 β E인 것을 특징으로 하는

발현백터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

8. 제 3항에 있어서,

숙주세포는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물 또는

살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물인 것을 특징으로 하는

발현백터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

5

10

15

20

25

30

35

ABSTRACT

The present invention provides an expression vector comprising a gene coding for OmpF protein in E. coli, E.coli transformed with the said expression vector, and a method for extracellular production of target proteins employing the said microorganism. The recombinant expression vector of the invention comprises ampicillin-resistant gene, OmpF promoter and OmpF gene. In accordance with the invention, a target protein can be produced extracellularly by simpler method than conventional methods in a manner that: secretory production of OmpF fusion protein begins simultaneously with growth of cells due to constitutive expression employing OmpF promoter, and as the concentration of cells increases, the amount of secretory production of the protein also increases continuously. Therefore, target proteins can be produced in large quantities by a high concentration culture of cells.

20

25

30

35

1/4

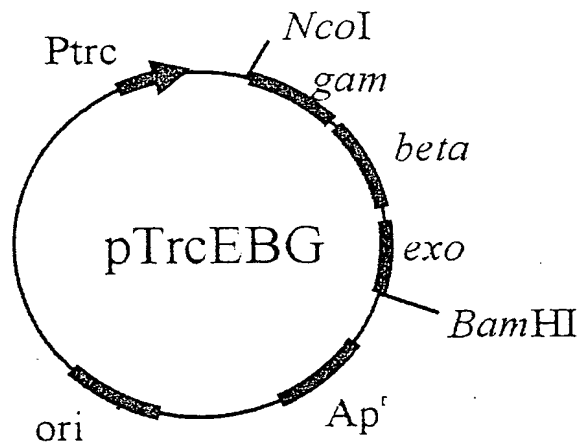


Fig. 1

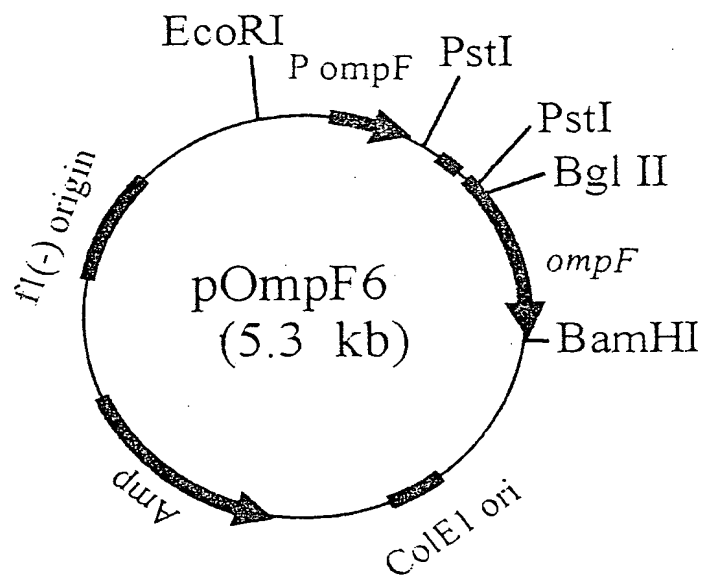


Fig. 2

2/4

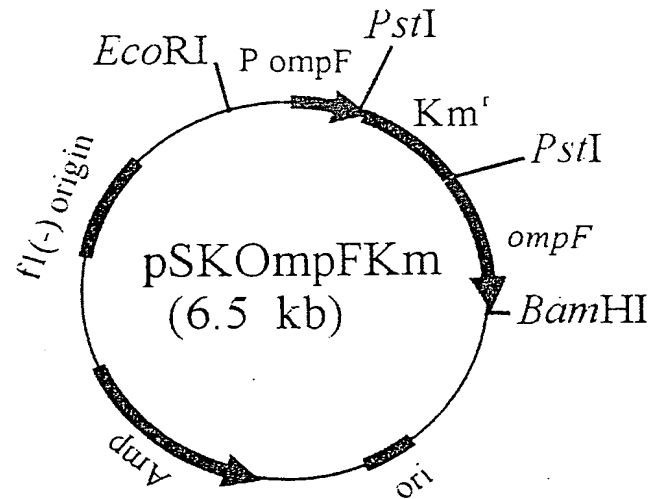


Fig. 3

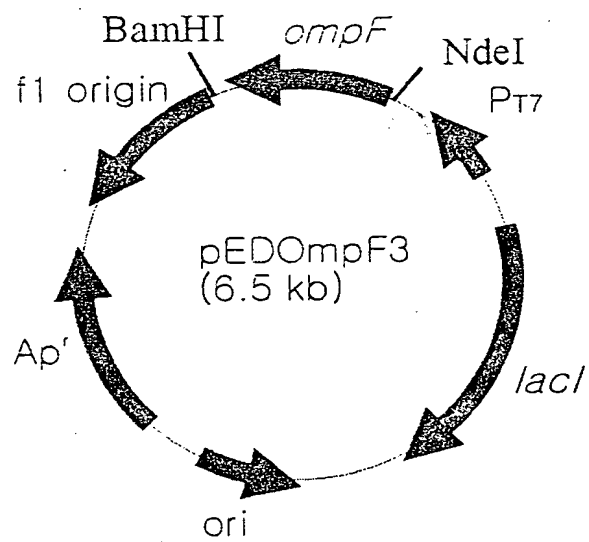


Fig. 4

3/4

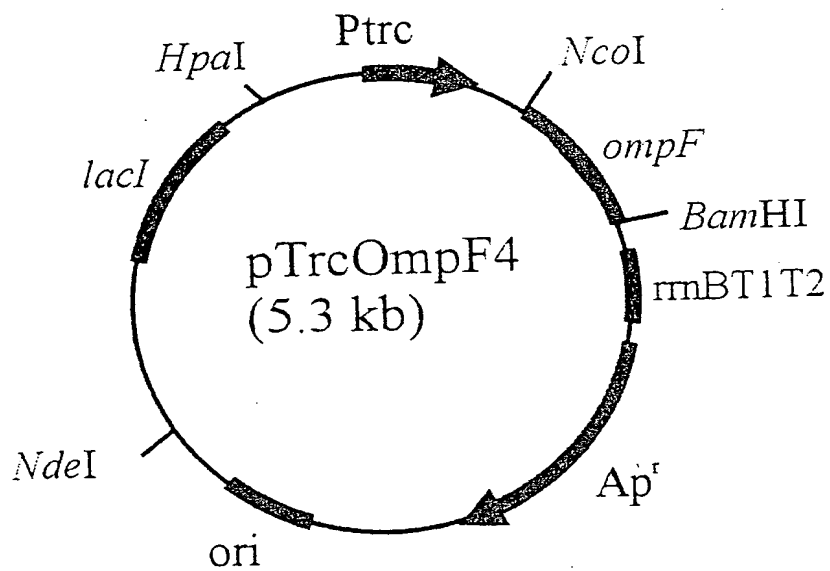


Fig. 5

4/4

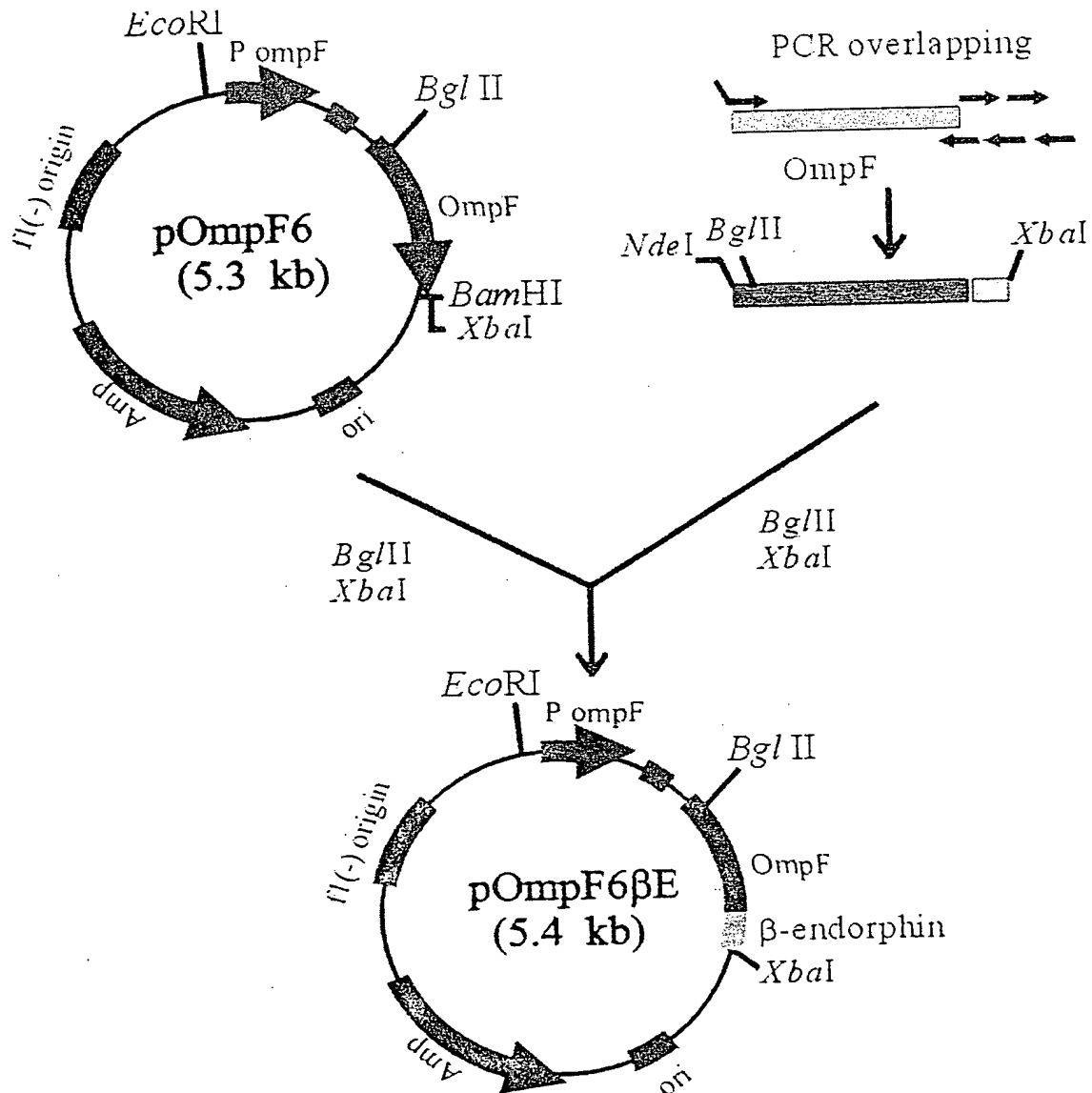


Fig. 6

SEQUENCE LISTING

<110> Korea Advanced Institute Science and Technology

5 <120> A Method for Extracellular Producing Target Proteins Employing
OmpF in E. coli

<130> DP10655

10 <160> 18

<170> KopatentIn 1.71

15 <210> 1
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> primer

<400> 1

25 cgcgccatgg atattaatac tgaaactgag atcaagc 37

<210> 2
<211> 32
30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

35 <400> 2

cgggatcctc atgccattg ctcccaaatt ac

32

<210> 3

5 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> primer

<400> 3

cggaattctg gattataccg acgcag

26

15

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

25

<400> 4

gcggatcctt agaactggta aacgatac

28

30 <210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

35 <220>

<223> primer

<400> 5

cgctgcagtt agaaaaactc atcgagcatc

30

5

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> primer

15 <400> 6

gcctgcaggc cacgttgtgt cctcaaa

27

<210> 7

20 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> primer

<400> 7

ccacagcaac ggtgtcgtct g

21

30

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

5 gatcggaatt gatttgagtt tcc

23

<210> 9

<211> 25

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

15

<400> 9

atctttatct ttgtagcact ttcac

25

20

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> primer

30 <400> 10

gcgaattcat atgatgaagc gcaatattct g

31

<210> 11

35 <211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

5

<400> 11

gcgaattcca tggatgaagcg caatattctg gcag

34

10 <210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <220>

<223> primer

<400> 12

20 accgccatac cttccctcga tgaactggta aacgata

37

<210> 13

<211> 41

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

30

<400> 13

ggaaggtatg gcggtttcat gaccagcgaa aaaagccaga c

41

35

<210> 14

<211> 44

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> primer

<400> 14

cgcggtttta aacaggggtca ccagcgggggt ctggcttttt tcgc

44

10

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

20

<400> 15

ccctgtttta aaacgcgatc atcaaaaacg cgtataaaaa ag

42

25 <210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> primer

<400> 16

35 gcggatccct attattcgcc tttttatag gcgttttg

39

<210> 17
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

5

<220>
 <223> Fusion Protein

10 <400> 17

Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr

1 5 10 15

Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu

15 20 25 30

20 <210> 18
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> fusion protein cDNA

<400> 18

30 tatggcggtt tcatgaccag cgaaaaaagc cagaccccg cggtagacct gtttaaaaac 60

gcatcatca aaaacgcgta taaaaaaggc gaataa 96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.